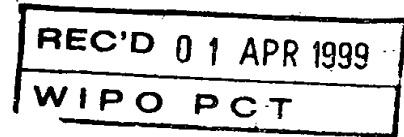


## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 99/00175



5

## Bescheinigung

Die Herren Dr. Florian Kern, Dr. Alexander Scheffold, Dr. Rainer Blaszyk, Professor Dr. Hans-Dieter Volk und Professor Dr. Peter Walden, alle in Berlin/Deutschland, haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Identifikation von T-Lymphozyten-stimulierenden Peptiden"

am 19. Januar 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole G 01 N und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 24. März 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Hofe

Aktenzeichen: 198 02 174.7



**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2

Belegexemplar  
Gef. nicht abgeben werden

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Identifikation von Peptiden, die T-Zellepitope enthalten und an definierte MHC-Moleküle gebunden werden. Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, daß die durch Peptide induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen durchflußzytometrisch erfaßt wird. Die erfindungsgemäße Verwendung der identifizierten Peptide besteht in der Generierung von T-Zell-Linien oder -Klonen sowie in der Bestimmung der Frequenz von T-Zellen oder in der Charakterisierung von T-Zellreaktionen (beispielsweise des Zytokinprofiles). Damit eignet sich die Erfindung z.B. zum T-Zell-Epitopmapping von Proteinantigenen oder zur Analyse von anderweitig ausgewählten Kandidatenpeptiden.

## Verfahren zur Identifikation von T-Lymphozyten-stimulierenden Peptiden

### Beschreibung

Belagungs-  
Befund nicht gegeben

Die Erfindung betrifft die Identifikation von Peptiden, die T-Zellepitope (immunologisch relevante Aminosäuresequenzen, die durch T-Zellen mittels des T-Zell-Rezeptors spezifisch erkannt werden) enthalten und an definierte MHC-Moleküle gebunden werden. Damit eignet die Erfindung sich z.B. zum T-Zell-Epitopmapping von Proteinantigenen oder zur Analyse von anderweitig ausgewählten Kandidatenpeptiden.

Es ist bekannt, daß an Moleküle der MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse I bindende Peptide in der Regel eine Länge von 9 – 11 Aminosäuren (AS) aufweisen, während Peptide, welche an MHC-Klasse II Moleküle binden, etwas länger und in der Länge stärker variabel sind. Neben den zur Verankerung in der Spalte des MHC-Moleküls dienenden Aminosäuren (Bindungsmotive) müssen bestimmte Sequenzen vorhanden sein, die von einem T-Zell-Rezeptor spezifisch erkannt werden (T-Zell-Epitope), damit das Peptid als T-Zell-Epitop funktioniert (Rammensee HG; Friede T; Stevanovic S; MHC ligands and peptide motifs: first listing; Immunogenetics 1995, 41(4):178-228). Die Bindung spezifischer T-Zellepitope an MHC-Moleküle ist Gegenstand der Patente DE 19534170, US 5635363 und US 5356779. In DE 19540515 wird ein Fusionsprotein beschrieben, das u.a. die Aminosäuresequenz einer Untereinheit des T-Zell-Rezeptorkomplexes enthält.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Peptide (Aminosäuresequenzen) zu identifizieren, die T-Zellen stimulieren können. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß die durch Peptide induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen unter optimierten Stimulationsbedingungen in vitro und auf Einzelzellebene erfaßt wird. Dazu werden T-Zellen in vitro mit einzelnen Peptiden oder Mischungen daraus unter optimierten Bedingungen stimuliert. Nach ausreichender Stimulationsdauer werden die Zellen mit einer geeigneten Methode markiert (mittels Antikörpern gegen Zytokine und T-Zell-Oberflächenantigene) und am Durchflußzytometer analysiert. Bei der Analyse werden die zytokinproduzierenden Zellen von den übrigen unterschieden und ihre Anzahl bzw. Frequenz innerhalb der jeweils untersuchten Population erfaßt. Neben der Fähigkeit, ein bestimmtes Zytokin zu produzieren, kann dabei auch das gesamte Zytokinprofil der Peptid- bzw. Antigenspezifischen T-Zellen analysiert werden.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe hat die Forderung zum Inhalt, daß die Peptide einerseits an definierte MHC-Moleküle binden und andererseits, daß diese Peptide Aminosäuresequenzen (Epitope) enthalten, welche mit der Antigenbindungsregion des T-Zellrezeptors (Paratop) eine Bindung eingehen können.

Die Erfindung macht sich zunutze, daß nur dann eine peptidinduzierte Zytokinproduktion in T-Zellen zustande kommen kann, wenn die oben angegebenen Forderungen erfüllt werden, also wenn eine Bindung an das präsentierende HLA (Human Leukocyte Antigen)-Molekül besteht und die T-Zelle über den T-Zellrezeptor ein Epitop erkennt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifikation von T-Lymphozyten-stimulierenden Peptiden ("T-Zellepitope") besteht darin, daß die durch Peptide induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen durchflußzytometrisch erfaßt wird, in vitro und auf Einzelzellebene. Dabei erfolgt die Zytokindetektion durch Untersuchung der Expression von Zytokinen auf Einzelzellniveau unter optimierten Stimulationsbedingungen.

Die Peptide sind Anteile von Proteinen, die aus dem menschlichen Organismus selbst, aus anderen Makro- oder Mikroorganismen oder aus Nahrungsmitteln stammen. Die Peptide werden bei der Beladung von Targetzellen eingesetzt.

Die erfindungsgemäße Verwendung der identifizierten Peptide besteht in der Generierung von T-Zell-Linien oder -Klonen sowie in der Bestimmung der Frequenz von T-Zellen oder in der Charakterisierung von T-Zellreaktionen (beispielsweise des Zytokinprofils), die sich gegen eben dieses Peptid oder das Protein oder Teile davon richten, in welchen dieses Peptid vorkommt.

Solche Peptide, als Anteile von Proteinen, können aus verschiedenen Quellen stammen (dem menschlichen Organismus selbst, aus Makro- oder Mikroorganismen, von

4

Krankheitserregern, aus Nahrungsmitteln, etc.). Das Einsatzgebiet der erfindungsgemäß identifizierten Peptide entspricht dem möglichen Einsatzgebiet anderweitig identifizierter T-Zellen-stimulierender Peptide. Solche Peptide können z.B. verwendet werden, um die Immunantwort zu stimulieren (im Sinne einer Vakzine) oder, um in vitro T-Zellen zu klonieren, welche als Medikament unterstützend die Immunantwort regulieren können (z.B. bei einer Infektion, Tumorerkrankung oder einer Autoimmunerkrankung). Das Einsatzgebiet solcher Medikamente bzw. Therapien sind allgemein gefaßt Krankheiten oder Zustände, welche mit einer Dysregulation oder Verminderung der zellulären Abwehr einhergehen, so z.B. auch der Zustand nach Knochenmarktransplantation oder der Transplantation solider Organe.

Solche Peptide sind darüber hinaus im Rahmen der Testung von T-Zellklonen bei der Beladung von Targetzellen (Zielzellen) einsetzbar, wodurch die Expression erregerspezifischer Peptide auf den Oberflächen-MHC-Molekülen dieser Targetzellen simuliert wird und die Targetzellen gegenüber erregerspezifischen T-Zellen empfindlich werden. Dadurch können Probleme, welche bei der Infektion von geeigneten Targetzellen mit dem zu untersuchenden Erreger oder bei der Transfektion geeigneter Targetzellen mit Genen von Krankheitserregern auftreten, vermieden werden.

Es ist von erheblichem Vorteil, daß bei Verwendung der Erfindung neben der Identifizierung T-Zellen-stimulierender Peptide auch die Bestimmung der Frequenz Peptid-spezifischer reaktionsfähiger T-Zellen in der untersuchten Zellsuspension (peripheres Blut oder andere geeignete Körperflüssigkeiten oder Kulturansätze) erfolgen und die antigenspezifische Antwort dieser T-Zellen charakterisiert werden kann (beispielsweise hinsichtlich der Produktion von löslichen Mediatoren, der Proliferation etc.). Im Vergleich mit den üblichen Methoden (Bulk-Kultur, Klonierung), welche Wochen bis Monate in Anspruch nehmen, ermöglicht die hier beschriebene Erfindung die Identifikation von T-Zellen-stimulierenden Peptiden innerhalb von Stunden.

Die Erfindung soll anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

### Ausführungsbeispiel

Periphere mononukleäre Blutzellen einer Patientin mit Antikörpern gegen das humane Cytomegalie-Virus mit definiertem HLA-Klasse I Typ und bekanntem Allel (HLA-A2, Allel A0201) wurden präpariert und unter optimierten Stimulationsbedingungen über 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Nonapeptiden (Peptiden von 9 Aminosäuren Länge)

aus dem pp65-Protein des humanen Cytomegalie-Virus stimuliert. Die Peptide stellen alle möglichen Bruchstücke von 9 Aminosäuren (AS) Länge eines aus der Literatur bekannten Peptides von 15 Aminosäuren Länge dar (Wills et al.: The human cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) response to Cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity and T cell receptor usage of pp65 specific CTL. Journal of Virology, Nov. 1996, S. 7569-7579). Zusätzlich wurden 2 weitere Peptide getestet, welche aufgrund rein theoretischer Erwägungen an das vorhandene MHC-Klasse I-Molekül binden sollten (A2.1). Von dem ursprünglichen Peptid mit 15 AS Länge war bekannt, daß es in der Bulk-Kultur aus peripheren mononukleären Blutzellen zur Generierung und Proliferation von zytotoxischen T-Zellen führt. Im Zytotox-Assay zeigte sich, daß nach einwöchiger Bulk-Kultur von PBMC mit dem beschriebenen Peptid zytotoxische T-Zellen generiert wurden, welche Peptidspezifität aufwiesen (s. Figur 2).

### Figur 1:

Darstellung von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-produzierenden T-Lymphozyten nach Stimulation mit verschiedenen Peptiden und Mischungen daraus.

Rechtsachse: Fluoreszenz 1 (IFN- $\gamma$ -FITC)

Hochachse: Fluoreszenz 2 (CD69-PE)

Elektronische Gattung auf CD3+ Lymphozyten (CD3-PerCP)

Figur 2:  
Zytotoxizitätstest

Folgende Peptide wurden eingesetzt:

- 1      Ala-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala
- 2          Arg-Asn-Leu-Val- Pro-Met-Val-Ala-Thr
- 3              Asn-Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val
- 4                  Leu-Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-Gln
- 5                      Val-Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-Gln-Gly
- 6                          Pro-Met-Val-Ala-Thr-Val-Gln-Gly-Gln
- 7                              Met-Val-Ala-Thr-Val-Gln-Gly-Gln-Asn-
  
- 8              Ile-Leu-Ala-Arg-Asn-Met-Val-Pro-Asn-Val
- 9              Ile-Pro-Ser-Ile-Asn-Val-His-His-Tyr

Das Peptid 3 (P3) führte zur Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen aus dem peripheren Blut. Es weist ein klassisches Bindungsmotiv für das MHC-Molekül HLA-A2.1 auf (L in Position 2 und V in Position 6 und 9).

Der dargestellte Zytotoxizitätstest (Figur 2) zeigt, daß es zur Generierung von Peptid-3-spezifischen zytotoxischen T-Zellen kommt, wenn mit dem besagten Peptid stimuliert wird. Die PBMC wurden über 9 Tage mit Peptid 3 und IL-2 stimuliert. Sie wurden dann gegen eine humane HLA-A2-positive Targetzelllinie eingesetzt, welche entweder mit P3, einem irrelevanten Peptid oder ohne Peptid vorinkubiert worden war.

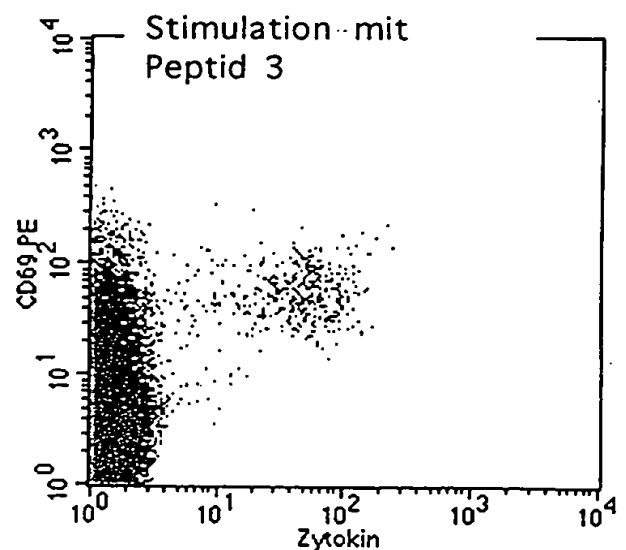
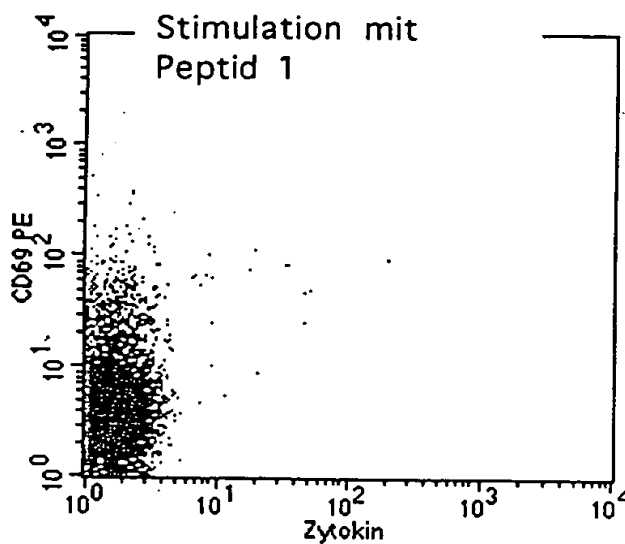
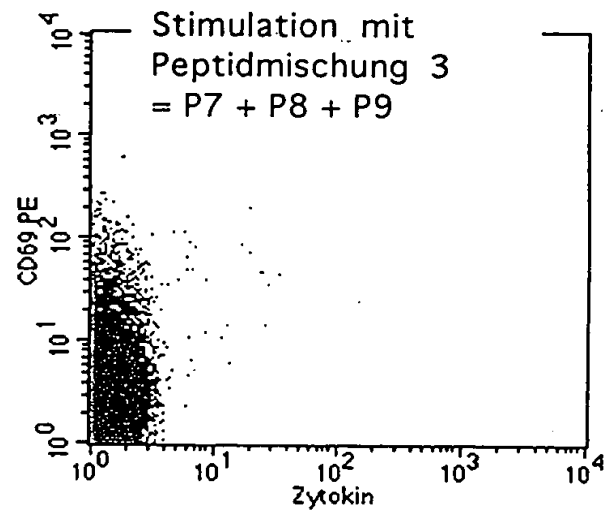
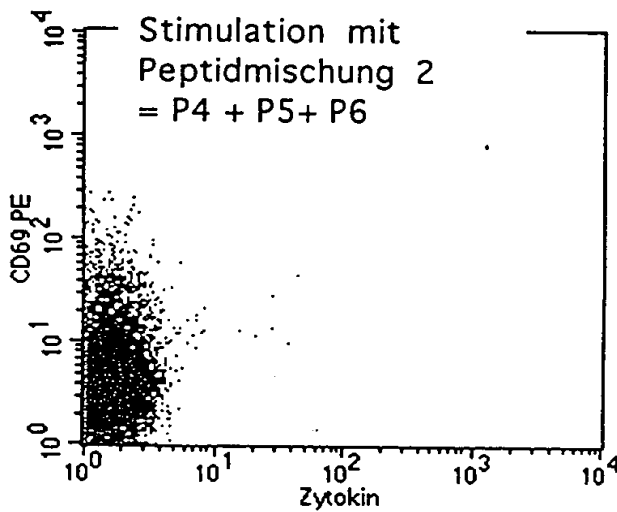
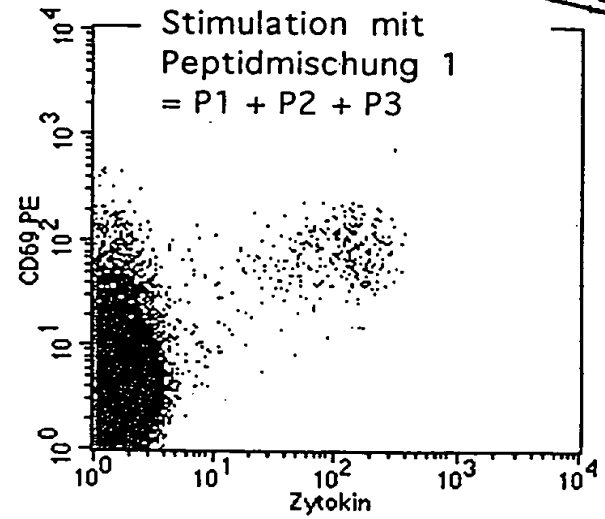
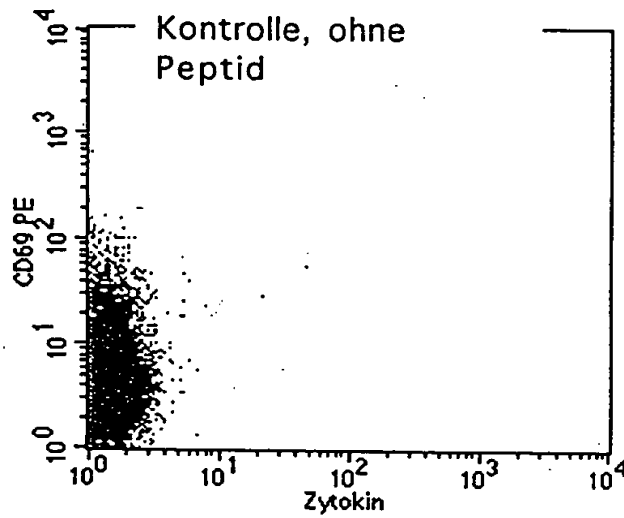
Die Differenz zwischen der spezifischen Lyse mit P3-vorinkubierten Zellen und den Ergebnissen mit dem irrelevanten Peptid oder ohne Peptid entspricht der durch die peptidspezifischen Killerzellen zusätzlichen Lyse, die deutlich über den Effekt in den beiden anderen Ansätzen (welcher durch unter IL-2-Einfluß gebildete Lymphokin-aktivierte Killerzellen und natürliche Killerzellen zustandekommt) hinausgeht, insbesondere bei niedrigeren Effektor:Target-Ratios.

**Pat ntsanspruch**

1. Verfahren zur Identifikation von T-Lymphozyten-stimulierenden Peptiden ("T-Zellepitope"), dadurch gekennzeichnet, daß die durch Peptide induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen erfaßt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Peptide induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen unter optimierten Stimulationsbedingungen in vitro und auf Einzelzelebene erfaßt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die induzierte Zytokinsynthese in T-Zellen durchflußzytometrisch erfaßt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die durchflußzytometrische Zytokindetektion durch Untersuchung der Expression von Zytokinen auf Einzelzellniveau unter optimierten Stimulationsbedingungen erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide Anteile von Proteinen sind, welche aus dem menschlichen Organismus selbst, aus anderen Makro- oder Mikroorganismen oder aus Nahrungsmitteln stammen.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide bei der Beladung von Targetzellen eingesetzt werden.
7. Verwendung von Peptiden, die nach Anspruch 1 bis 5 identifiziert worden sind, zur Generierung von T-Zell-Linien oder -Klonen.
8. Verwendung von Peptiden, die nach Anspruch 1 bis 5 identifiziert worden sind, zur Bestimmung der Frequenz von T-Zellen, die sich gegen eben dieses Peptid oder das Protein oder Teile davon richten, in welchen dieses Peptid vorkommt.
9. Verwendung von Peptiden, die nach Anspruch 1 bis 5 identifiziert worden sind, zur Charakterisierung von T-Zellreaktionen (beispielsweise des Zytokinprofiles), die sich gegen eben dieses Peptid oder das Protein oder Teile davon richten, in welchen dieses Peptid vorkommt.

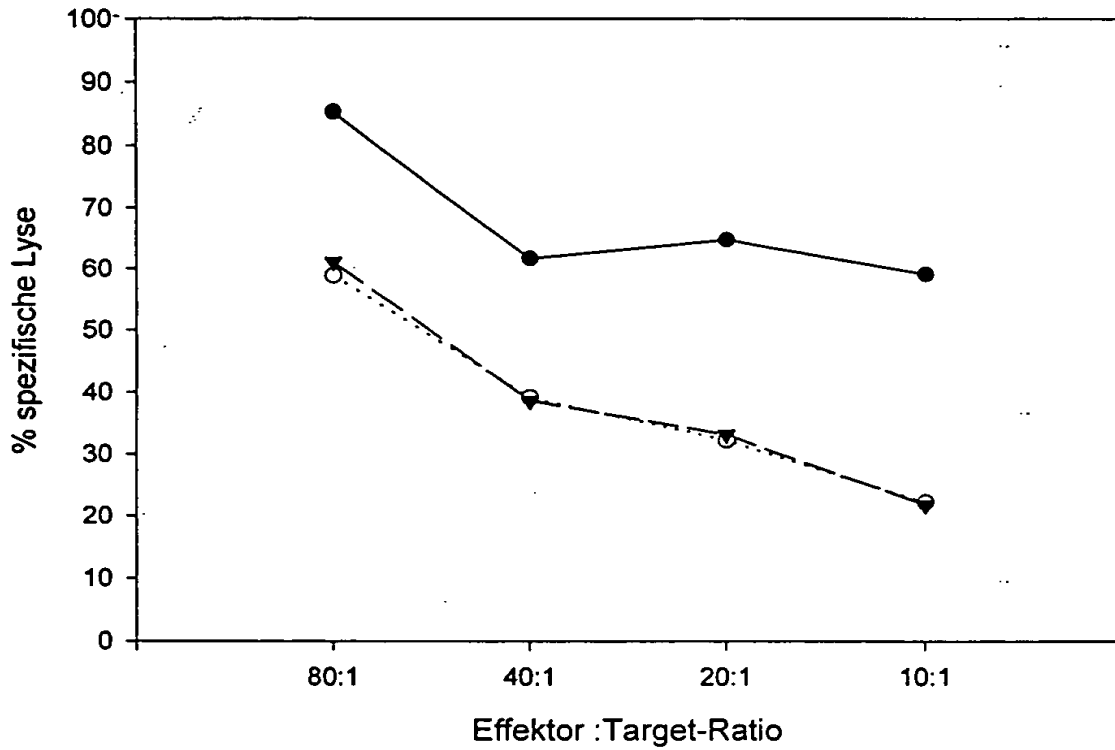
Figur 1

Belegexemplar  
Dart nicht geändert werden



Figur 2

Beispiel  
Cytotoxizität



- MZ versus HLA-A2-pos. Target cells plus Peptid 3
- .....○..... MZ versus HLA-A2-pos. Target cells ohne Peptid
- ▲- MZ versus HLA-A2-pos. Target cells plus irrelevantes Peptid